

**Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta**

Biologické účinky jedlých řas

Mgr. Kateřina Vaňková

2018

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.

Školící pracoviště: ÚLBLD, 1. LF UK v Praze

Školitel: Prof. MUDr. Libor Vitek, PhD., MBA

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Abstrakt:

Nutriční příjem látek s antioxidačními a dalšími bioaktivními vlastnostmi, jako těch, které jsou obsaženy v jedlých řasách nebo v zelených rostlinách, by mohl mít vliv na ochranu proti vzniku nádorových onemocnění. Chlorofyly a další tetrapyrrolové sloučeniny, které jsou strukturně podobné hemu a antioxidačně působícímu žlučovému pigmentu bilirubinu, patří k důležitým kandidátním molekulám, které by mohly být zodpovědné za tyto účinky. Na základě našich studií prokazujících antiproliferační účinky extraktu jedlé sinice *S. platensis* na experimentálním modelu lidského adenokarcinomu pankreatu jsme detailně studovali účinky chlorofylu abundantně se vyskytujícího v této sinici. Vzhledem k tomu, že existují jen omezené údaje o antiproliferačních účincích chlorofylů, bylo cílem naší studie zhodnotit tyto účinky.

Studie byla provedena na experimentálních modelech lidského adenokarcinomu pankreatu a prostaty. V *in vitro* studiích byl prokázán inhibiční účinek chlorofylů (chlorofylu *a*, chlorofylu *b*, chlorofyllinu a feofytinu *a*) na buněčnou proliferaci a viabilitu studovaných nádorových buněk. Chlorofyly snižovaly významně expresi mRNA i aktivitu hemoxygenázy. Chlorofyly významně ovlivňovaly redoxní prostředí nádorových buněk včetně vlivu na mitochondriální membránový potenciál, produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) v mitochondriích i v celých buňkách, stejně tak jako poměr redukovaného a oxidovaného glutathionu, který je významným buněčným antioxidantem. Protinádorové účinky chlorofylu byly potvrzeny v *in vivo* studii na athymických nu/nu myších xenotransplantovaných lidskými pankreatickými nádorovými buňkami, ve které zvířata léčená chlorofylem vykazovala významně nižší růst a proliferaci nádorů v porovnání s kontrolní skupinou.

Závěrem lze říci, že mechanismus antiproliferačního působení chlorofylů probíhá na více úrovních mechanismů ovlivnění redoxního prostředí buněk. Tato data potvrzují ochranný vliv rostlinné stravy na vznik nádorových onemocnění pozorovaný v klinicko-epidemiologických studiích.

Abstract:

Nutritional factors with antioxidant properties, such as those contained in edible algae or green plants, might be implicated in protection against cancer development. Chlorophyll and other tetrapyrrolic compounds, structurally related to heme and antioxidant bile pigment bilirubin, belong to important candidate molecules, which might be responsible for these effects. Based on our studies demonstrating antiproliferative effects of *S. platensis* edible alga extract on experimental model of human pancreatic adenocarcinoma we investigated in detail the effect of chlorophyll occurring abundantly in this alga. Since only scarce data exist on the antiproliferative effects of chlorophylls, the aim of our study was to assess these effects.

The study was performed on experimental models of human pancreatic and prostate cancer. The inhibitory effects of chlorophylls (chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, chlorophyllin and pheophytin *a*) on cell proliferation and cell viability were investigated in *in vitro* studies. Chlorophylls reduced the mRNA expression as well as activity of hemoxygenase in tested pancreatic cancer cells. Simultaneously, chlorophylls played an important role in redox environment of studied cancer cell lines including modulation of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species (ROS) production in mitochondria as well as in the whole cells, and change in proportion of reduced and oxidized glutathione. Anti-cancer effects of chlorophyll *a* were proved in *in vivo* experiments on pancreatic cancer cells xenotransplanted to nude mice.

In conclusion, the mechanisms of antiproliferative effects of chlorophyll are multiple, including the effects on the expression of key genes involved in antioxidant protection, as well as direct free radical scavenging affecting substantially the cell redox environment. This data confirms protective effect of plant food on incidence of cancer diseases observed in clinical and epidemiological studies.

Obsah

1	Úvod	6
1.1	Anotace.....	6
1.2	Chlorofyly jako biologicky aktivní sloučeniny.....	6
1.3	Degradace porfyrinů.....	6
1.4	Metabolické dráhy ovlivňované porfyriny	7
1.5	Oxidační stres a antioxidační ochrana buněk.....	8
1.6	Respirační řetězec a aerobní fosforylace	8
1.7	Role ROS u nádorových buněk.....	9
1.8	Buněčná smrt a mitochondriální membránový potenciál (MMP).....	9
2	Hypotézy a cíle disertační práce.....	9
3	Materiál a metody.....	10
3.1	Příprava experimentálních sloučenin	10
3.2	UV/VIS spektroskopie	10
3.3	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	10
3.4	Hmotnostní spektroskopie	10
3.5	Spektroskopie vibračního cirkulárního dichroismu (VCD), elektronového cirkulárního dichroismu (ECD), a infračervená spektroskopie (IČ)	11
3.6	Buněčné linie	11
3.7	Testy viability	11
3.8	Stanovení počtu buněk	11
3.9	Klonogenní analýza.....	12
3.10	Stanovení aktivity HMOX.....	12
3.11	Izolace RNA a Real-time PCR.....	12
3.12	Stanovení MMP	12
3.13	Stanovení mitochondriální produkce superoxidu.....	13
3.14	Stanovení redoxního stavu glutathionu (GSH/GSSG)	13
3.15	Stanovení produkce H ₂ O ₂	13
3.16	Stanovení antioxidační kapacity chlorofylů.....	13
3.17	Stanovení redukční karboxylace	14
3.18	Stanovení aktivace ERK a AKT	14
3.19	<i>In vivo</i> experimenty.....	14
4	Výsledky a diskuze.....	15
5	Závěr.....	19
6	Literatura.....	20
	Seznam publikací.....	24
	Účasti na konferencích.....	24

Seznam zkratk:

HMOX1	hemoxygenáza
BLVRA	biliverdinreduktáza
MTT	thiazolyl blue tetrazolium bromid
CV	krystalová violet
DMSO	dimetylsulfoxid
ATP	adenosintrifosfát
RNA	ribonukleová kyselina
CO	oxid uhelnatý
NADPH	β -nikotinamidadeninukleotidfosfát
<i>S. platensis</i>	<i>Spirulina platensis</i>
ROS	reaktivní formy kyslíku
MMP	mitochondriální membránový potenciál
GSH	redukováný glutathion
GSSG	glutathion
VCD	spektroskopie vibračního cirkulárního dichroismu
ECD	spektroskopie elektronového cirkulárního dichroismu
IČ	infračervená spektroskopie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MS	hmotnostní spektra
RT-PCR	(Real Time) polymerázová řetězová reakce
GC-RDG	plynový chromatograf s detektorem redukčního plynu
RES	retikuloendoteliální systém

1 ÚVOD

1.1 ANOTACE

Nutriční faktory se významně podílejí na patogenezi nádorových onemocnění [1], obzvláště pak u západních typů diet bohatých na nasycené tuky a současně postrádajících ochranné látky. Mezi důležité nutrienty patří zejména látky schopné potlačovat oxidační stres. Takovými nutrienty mohou být látky obsažené v listové zelenině [2], zejména pak zelená barviva (chlorofyly). Příjem potravin bohatých na antioxidanty, jako jsou např. jedlé řasy a zelená listová zelenina, působí příznivě na lidský organismus. Několik experimentálních studií prokázalo antioxidační účinky [3] a protektivní účinky chlorofylů na progresi nádorů [4, 5]. Tato data jsou pak podpořena epidemiologickými studii naznačujícími, že konzumace zelených rostlin obsahujících chlorofyly by mohla mít vliv na prevenci nádorových onemocnění [6], avšak existuje jen málo studií o působení těchto molekul a jejich vliv na redoxní prostředí buněk či ovlivnění různých biologických drah není známý. Na základě předchozího studia působení *S. platensis* na nádorové buňky jsme se zaměřily na chlorofyly, jako na potenciální látky s protinádorovými účinky. [7]

Tetrapyrolová část chlorofylů má podobnou strukturu jako bilirubin a biliverdin, což jsou žlučové pigmenty s prokázanými velmi silnými antioxidačními [8] a dalšími biologickými vlastnostmi [9]. Oba tyto žlučové pigmenty vznikají v organismu degradací hemu během rozpadu červených krvinek. Z hemu působením enzymu hemoxygenázy 1 (HMOX1) [10] vzniká biliverdin, který je redukován enzymem biliverdinreduktázou (BLVRA) na bilirubin. Bilirubin je obecně známý jako jeden z hlavních antioxidantů a jeho mírně zvýšená koncentrace v krevním řečišti je spojována s nižším výskytem onemocnění podmíněných oxidačním stresem, včetně onemocnění kardiovaskulárních, autoimunitních i nádorových.

Na základě podobnosti struktur chlorofylů s hemem a žlučovými pigmenty se tedy lze domnívat, že i jejich biologické a antioxidační účinky budou podobné. Předpokládá se, že dietní příjem chlorofylu rostlinného původu by mohl být asociován s nižší prevalencí onemocnění podmíněných oxidačním stresem, ačkoli přesná data o možných protektivních účincích chlorofylů nejsou k dispozici.

1.2 CHLOROFYLY JAKO BIOLOGICKY AKTIVNÍ SLOUČENINY

Všechny tetrapyrolové sloučeniny, včetně chlorofylů, mají střídavý systém konjugovaných dvojných vazeb svých pyrolových kruhů. Při interakci volného radikálu s takovou molekulou dochází k přeuspořádání vazeb a k pohlcení volného radikálu. [11, 12] Chlorofyly tedy mohou působit jako přímé antioxidanty a mohou přispívat ke snížení oxidační zátěže organismu. Bylo zjištěno, že chlorofyly se v organismu uplatňují jako velice účinné biologicky aktivní sloučeniny, které jsou schopny změnit aktivní formu mutagenů a karcinogenů biologickou transformací na neaktivní látky. Jedním z hlavních mechanismů působení chlorofylů je změna koncentrace volného karcinogenu vytvořením kovalentní vazby za vzniku komplexu karcinogen-chlorofyl, který ztrácí své biologické vlastnosti; dále je to inhibice metabolické aktivace mutagenů a v neposlední řadě degradace konečné aktivní formy mutagenů [13]. V již zmíněné dietě v zemích západní Evropy a ve Spojených státech (Western diet) vznikají v organismu z potravy heterocyklické aromatické aminy (především při tepelném zpracování potravy; kouřením tabáku), které jsou známými mutageny a karcinogeny. Jsou schopny přímé interakce s DNA prostřednictvím tvorby kovalentních aduktů skrze aktivaci enzymů cytochromu P450 v játrech. Tento proces může působit v organismu různé mutace a přispívat k rozvoji nádorových onemocnění. Dalšími mutagenními látkami jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, ethyidium bromid, aflatoxiny, akridinová barviva a některé léky, které jsou součástí chemoterapie (daunomycin, doxorubicin, mitoxantron). Bylo zjištěno, že některé přírodní biologicky aktivní aromatické sloučeniny (jako např. chlorofyly) mohou chránit před genotoxickými účinky těchto, pro organismus, nebezpečných látek [14-16]. Chlorofyly *a*, *b* či feofytiny nejsou rozpustné ve vodě, a proto chlorofyly jako zdroj z potravy mají menší šanci se vstřebat do organismu, pokud nejsou přijímány zároveň s tuky. Na druhé straně chlorofylin, který je zcela rozpustný ve vodě, je pro organismus lépe dostupný [17].

1.3 DEGRADACE PORFYRINŮ

Během rozpadu červených krvinek se uvolňuje v lidském organismu zhruba 300 mg hemu, ze kterého následně vzniká až 300 mg bilirubinu [18]. Tetrapyrolový hem v buňkách retikuloendotelového systému (RES) indukuje enzym HMOX1 a za uvolnění železnatých iontů a oxidu uhelnatého vzniká lineární tetrapyrrol

biliverdin. Působením enzymu BLVRA následně dochází k redukci centrálního methinového můstku a biliverdin je přeměněn na nekonjugovaný bilirubin, který je velice špatně rozpustný. Z RES buněk je bilirubin dále transportován do hepatocytů, metabolizován odchází žlučovým systémem do tenkého střeva, odkud je spolu se svými degradačními produkty vylučován z těla. Ve velmi nízké koncentraci (cca do 70 nM) je bilirubin v krevním řečišti ve volné formě, tedy nenavázaný na vazebnou bílkovinu. Tato velice nízká koncentrace je však velice důležitá. Bilirubin se díky svému redoxnímu cyklu stává v organismu velice důležitým antioxidantem. Antioxidační účinky jsou vysvětlovány zejména přítomností C10 methylenové skupiny, která slouží jako ochotný donor elektronu reaktivním formám kyslíku v krevní plazmě a tkáních [10]. Působením ROS z bilirubinu vzniká biliverdin a ten je opět zpětně přeměňován na bilirubin [19].

Distribuce sloučenin chlorofylu v lidském organismu na druhou stranu není příliš známá. Chlorofyly přijaté z potravy jsou přeměněny na micely a jejich metabolity se v krevním řečišti z velké části vážou na plasmatické proteiny. Byly zjištěny také velké rozdíly v resorbovatelnosti derivátů chlorofylu.

Byla provedena modelová studie na psech, která se snažila objasnit vstřebání chlorofylu do organismu ze špenátu obsaženého v potravě. K absorpci chlorofylu z potravy docházelo ze cca 2 – 4 %, zbylé metabolity byly vyloučeny stolicí. [20] Předpokládá se, že i takto malé procento absorbovaného chlorofylu postačuje k zajištění protektivních biologických účinků (antioxidační ochrana, protinádorové působení atd.). Vylučování chlorofylu stolicí může být výhodou, protože některé studie dokazují, že chlorofyly mají vliv na snížení rizika vzniku kolorektálního karcinomu [21, 22].

1.4 METABOLICKÉ DRÁHY OVLIVŇOVANÉ PORFYRINY

Jak již bylo zmíněno, tetrapyrolová část chlorofylů má velmi podobnou strukturu jako bilirubin a biliverdin. Antioxidační a antiproliferační účinky bilirubinu a biliverdinu byly popsány nejen v experimentálních studiích, ale také v celé řadě klinických pozorování [23, 24].

Protože data týkající se molekulární podstaty možných protektivních účinků chlorofylů nejsou příliš známá, předpokládali jsme, že budou ovlivňovat metabolické dráhy shodné s těmi, které ovlivňuje bilirubin. Tyto specifické dráhy se uplatňují v buněčné signalizaci, imunitní odpovědi, regulaci produkce volných kyslíkových radikálů i buněčné proliferaci. Zaměřili jsme se proto na studium následujících drah:

a) HMOX dráha

HMOX je hlavním enzymem v katabolismu hemu a je jedním z klíčových enzymů obrany před oxidačním stresem. Studie z posledních let poukazují na významnou úlohu HMOX v cytoprotekci. Indukce HMOX různými chemickými induktory poskytuje ochranu kultivovaným buňkám *in vitro* a *in vivo*. [25] Cytoprotektivní účinky tohoto enzymu jsou při jeho overexpressi zprostředkovány především zvýšenou odolností buněk vůči apoptóze a zvýšením buněčného růstu. Předpokládá se, že HMOX vytváří tento antiapoptotický účinek několika mechanismy, a to snížením hladin intracelulárních prooxidantů, zvýšením hladin bilirubinu a zvýšením produkce oxidu uhelnatého. Oxid uhelnatý může vyvolat antiapoptotický účinek inhibicí exprese p53 a inhibicí uvolňování mitochondriálního cytochromu c. [25] Avšak cytoprotekce u nádorových buněk není žádoucí a indukce HMOX v některých nádorových tkáních a buněčných liniích je spojována s podporou růstu a progresí nádorů [9]. HMOX hraje tedy důležitou roli v kancerogenezi; její overexprese za určitých podmínek podporuje také syntézu vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) [26], avšak může mít i antiangiogenní účinky [27]. Snížená HMOX aktivita v nádorových tkáních je spojována s aktivací nádorové apoptózy a je spojována s nižším buněčným růstem. Patří mezi tzv. heat-shock proteiny rodiny HSP32 a k její aktivaci dochází mimo jiné také stimulací oxidačním stresem, či zvýšeným množstvím tetrapyrolového hemu. Indukce HMOX bývá tedy spojována se zvýšeným oxidačním stresem, avšak vliv tohoto enzymu na kancerogenezi je značně kontroverzní a jeho role zatím není zcela objasněna.

Součástí této dráhy je i enzym BLVRA, který se vyskytuje zejména v tkáních s vysokou aktivitou HMOX, kde redukuje biliverdin za vzniku bilirubinu. Uplatňuje se v protekci před řadou patologických stavů zahrnujících onemocnění gastrointestinálního traktu, ledvin a centrálního i periferního nervového systému.

b) Redoxní signalizační dráha

Protože redoxní signalizační dráha ovlivňuje proliferaci jak normálních, tak i nádorových buněk, zaměřili jsme se také na mitochondriální redoxní systém a produkci volných radikálů. Hlavním zdrojem intracelulárních volných kyslíkových radikálů v rámci bazálních podmínek je superoxid vznikající v dýchacím řetězci mitochondrií. Mitochondriální superoxid přitom aktivuje řadu intracelulárních cílů, včetně NF- κ B (p50, p65 podjednotky nukleárního faktoru kappa B) [28], mTOR (mammalian target of rapamycin) [29], inflammasomu, které představují významné patogenní faktory v kancerogenezi.

1.5 OXIDAČNÍ STRES A ANTIOXIDAČNÍ OCHRANA BUNĚK

ROS jsou meziprodukty redukce kyslíku na vodu. Jsou to silně oxidativní látky nebo extrémně reaktivní volné radikály poškozující buňky i funkční molekuly, avšak jsou nedílnou součástí žijícího aerobního organismu. ROS mohou být prospěšné, protože se podílejí na tvorbě energie [30], účastní se biotransformace xenobiotik (hydroxylace, zvýšení rozpustnosti a detoxikace látek) [31], jsou součástí obranyschopnosti organismu [32] a jsou také signalizačními molekulami [33]. Cílem signalizace jsou transkripční faktory, proteinkinázy a fosfatázy, které jsou aktivovány oxidačním stresem a výsledkem může být stimulace buněčné proliferace (Akt, ERK), indukce apoptózy (p53), produkce protilátek (NF- κ B) či stárnutí buněk [34]. ROS jsou nedílnou součástí respiračního řetězce, který se stává největším producentem kyslíkových radikálů v organismu [35, 36]. Přenosem jednoho elektronu na molekulu kyslíku vzniká extrémně reaktivní superoxidový radikál [37]. Významným producentem ROS jsou aktivované fagocyty. V případě zánětu nebo napadení mikroorganismy je skrze NADPH oxidázu spuštěna tvorba superoxidu, dále peroxidu vodíku a dalších ROS k likvidaci patogenních látek [38].

K oxidačnímu stresu v organismu dochází v situaci, kdy je tvorba ROS převážena nad antioxidační schopností buněk. Tato velice důležitá rovnováha je udržována systémem antioxidační obrany organismu. [39]

ROS v organismu

V organismu vzniká velké množství reaktivních forem kyslíku. Jedním ze systému ochrany každé buňky před ROS (superoxidy, peroxidy, hydroxyly atd.) je přítomnost antioxidantů (např. vitamínů E, C a A, karotenoidů, kyseliny lipoové, glutathionu, albuminu a bilirubinu) a antioxidačních enzymů (superoxiddismutázy, Glutathionperoxidázy, katalázy, HMOX a BLVRA). HMOX a BLVRA jsou enzymy katalyzující rozpad hemu a jejich hlavní antioxidační působení spočívá v produkci biliverdinu a bilirubinu. BLVRA regeneruje bilirubin v redoxním cyklu a bylo zjištěno, že snížené hladiny BLVRA vedou k několikanásobnému nárůstu ROS v buňkách [10] a stejně tak tomu je i při deficienci HMOX [40].

1.6 RESPIRAČNÍ ŘETĚZEC A AEROBNÍ FOSFORYLACE

Buněčná respirace a tvorba energie probíhá na vnitřní straně mitochondriální membrány, z níž lze izolovat pět multienzymových lipoproteinových komplexů, jejichž substráty jsou mobilními složkami dýchacího řetězce a aerobní fosforylace a jsou označovány čísly I až V. [41-43] Buněčná respirace vede k rozdílům v koncentraci protonů uvnitř a vně membrány, tvoří se membránový potenciál, a tok protonů způsobený rozdílnými koncentracemi způsobuje vznik protonového gradientu. [44] Komplex V, ATP-syntáza, využívá tohoto gradientu pro tvorbu energie. [45]

Membránový potenciál hraje důležitou roli pro normální funkci buňky, např. pro přenos nervového vzruchu, účasti na aktivním transportu látek v mitochondriích nebo pro tvorbu energie v procesu aerobní fosforylace. [46] Proces přenosu elektronů v dýchacím řetězci může být inhibován různými látkami, které specificky působí na určitém místě dýchacího řetězce (např. rotenon [47] je inhibitory komplexu I, ATP-syntáza je inhibovatelná oligomycinem. [48]). Některé látky jsou schopny přenášet proton přes vnitřní membránu mitochondrie z mezimembránového prostoru do matrix a tím způsobují pokles protonového gradientu bez vzniku ATP. [49] Tyto látky označujeme jako rozpráhovače. Použitím substrátů dýchacího řetězce, specifických inhibitorů, rozpráhovačů a ionoforů je možné testovat a hodnotit funkci dýchacího řetězce jako celku nebo také jednotlivých enzymů dýchacího řetězce.

Přenos elektronů v respiračním řetězci produkuje velké množství ROS a mitochondrie jsou jejich největším producentem v organismu [35, 36]. Jak již bylo zmíněno, kyslíkové radikály mají nejen nesmírně důležitou

úlohu při tvorbě buněčné energie, ale jsou také významnými signálními molekulami a účastní se obranyschopné reakce organismu před patogeny.

1.7 ROLE ROS U NÁDOROVÝCH BUNĚK

Ačkoli je hladina ROS v mitochondriích přísně regulována, stává se tato organela majoritním zdrojem ROS v buňce. ROS mají v intracelulárním prostoru nesmírně důležitou funkci signálních molekul, přičemž přispívají k řadě buněčných procesů, jako je například proliferace zdravých buněk, účastní se regulace hypoxií indukovaných faktorů (HIFs) a jsou důležitými mediátory signalizačních kaskád růstových faktorů. Nádorové buňky využívají mitochondriální ROS ku svému prospěchu, zejména pro nadměrnou aktivaci růstových faktorů a udržování angiogeneze v hypoxických podmínkách. [50] Abnormální buněčný růst nádorových buněk je možný zejména díky aktivaci onkogenů a ztrátě tumor supresorů, které by proliferaci utlumily. [51] Je známo, že samy nádorové buňky produkují ROS ve zvýšené míře, a to především ve formě peroxidu vodíku [52]. Zvýšený oxidační stres u nádorových buněk je částečně způsoben onkogenní stimulací, zvýšenou metabolickou aktivitou a mitochondriálními poruchami. [53] Takto produkované ROS podporují tumorigenezi oxidačním poškozením DNA, které podporuje genetickou nestabilitu, a biochemickými a molekulárními změnami, které jsou nezbytné k progresi nádorů [54]. Na druhé straně příliš vysoké až toxické hladiny ROS by mohly vést k poškození mitochondriálních membrán, zprostředkovaného volnými radikály, následně by docházelo k uvolňování cytochromu c z mitochondrie a ke spuštění apoptózy nádorových buněk. [55] To vede k otázce, zda by se produkce ROS v nádorových buňkách měla potlačovat, nebo naopak vyvolat až toxické hladiny ROS a dovést tak buňku k apoptóze [56, 57]. Pokud však řízení nedochází k potlačení přirozené aktivity superoxididismutázy, produkce superoxidu není natolik velká, aby spustila buněčnou apoptózu a superoxid může působit pozitivně na progresi nádorů. [58] Většina nádorových buněk se vyznačuje přítomností mutace v mitochondriálním genomu a/nebo změnou obsahu mitochondriální DNA, což vede k poruchám mitochondriálních funkcí [59, 60].

Na rozdíl od zdravých diferenciovanych buněk, které získávají energii především z aerobní fosforylace v mitochondriích, většina nádorových buněk využívá pro získání energie aerobní glykolýzu. [61] Nádorové buňky mění svůj metabolismus s cílem podpořit růst, přežívání a proliferaci. Spotřebovávají zvýšené množství glukózy, kterou přeměňují na laktát, přičemž je glykolýza téměř úplně odpojena od respiračního řetězce. Tento jev je pozorován i u nádorových buněk se zcela funkčními mitochondriemi a nazývá se Warburgův efekt. [62-64] Aerobní glykolýza je velice neefektivní způsob výroby ATP oproti klasické aerobní fosforylaci, avšak umožňuje nádorovým buňkám snadnější zavádění a zabudovávání živin (například nukleotidů, aminokyselin a lipidů) do biomasy potřebné pro stavbu nové buňky. [65] Vzhledem k tomu, že generace ATP prostřednictvím glykolýzy je méně účinná, než prostřednictvím mitochondriální respirace je paradoxem, jak nádorové buňky s touto metabolickou nevýhodou mohou přežít konkurenci zdravých buněk. Odpovědí může být, že buňky s defektem mitochondriální respirace aktivují Akt dráhu pro přežití prostřednictvím nového mechanismu skrze NADH. Respiračně deficientní buňky tak vykazují závislost na glykolýze, zvýšeném NADH a aktivaci Akt, což vede k rezistenci vůči lékům a výhodám pro přežití buněk v hypoxických podmínkách. [66, 67]

1.8 BUNĚČNÁ SMRT A MITOCHONDRIÁLNÍ MEMBRÁNOVÝ POTENCIÁL (MMP)

Buněčná smrt je velice důležitým procesem, který pomáhá udržení tkáňové homeostázy především odstraněním infikovaných, mutovaných nebo poškozených buněk. [68] Deregulace apoptózy vede k imunodeficienci, nádorovým a autoimunitním onemocněním. [69] Mitochondriální buněčná smrt je charakteristická změnou transmembránového potenciálu a jeho narušení vede k permeabilizaci mitochondriální membrány s následným uvolněním proapoptotických faktorů z intermembránového mitochondriálního prostoru do cytosolu. [70] Depolarizace mitochondriální membrány vede k inhibici respirace a ztrátě produkce ATP. [71]

2 HYPOTÉZY A CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Naši hlavní hypotézou byl předpoklad, že přírodní tetrapyroly budou působit stejně prospěšně jako známý antioxidant s ochrannými biologickými vlastnostmi, bilirubin. Na základě námi vyzkoumaných dat o

působení *S. platensis* jsme vytipovali několik molekul, které by mohly být zodpovědné za antiproliferační a antioxidační působení této sinice. Podobnost tetrapyrolových molekul s bilirubinem nás vedla k bližšímu zkoumání biochemických drah jím ovlivňovaných.

Hlavním cílem disertační práce bylo posoudit potenciální chemopreventivní a antiproliferační účinky tetrapyrolů jedlých řas/sinic na experimentálních *in vitro* a *in vivo* modelech nádorových onemocnění. Studován byl vliv extraktu sinice řasy *S. platensis*, v dalších studiích pak detailně biologický potenciál chlorofylů, tetrapyrolů přítomných v sinicích i zelených rostlinách.

Přínosem výsledků mělo být bližší porozumění či objasnění mechanismů předpokládaného protektivního působení rostlinných tetrapyrolů, jejich role při ochraně proti zvýšení oxidačního stresu a kancerogenezi. Získané poznatky by měly v klinické praxi velký význam zejména pro chemoprevenci či adjuvantní léčbu nádorových onemocnění.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 PŘÍPRAVA EXPERIMENTÁLNÍCH SLOUČENIN

Příprava vodného extraktu S. platensis

Vodný extrakt byl připravován v koncentraci 1 g *S. platensis* na 30 ml vody. Tento roztok byl sonifikován po dobu 15 minut, inkubován 10 minut při pokojové teplotě, centrifugován (8000 g, 30 min, 10 °C) a následně lyofilizován přes noc.

Příprava chlorofylu a

Ze sinice *S. platensis* byl izolován také chlorofyl *a*. Izolace chlorofylu *a* byla nezbytná pro provedení *in vivo* studií a byla součástí práce. Výsledný postup izolace chlorofylu *a* byl modifikací metody dle Iriyama et al. [72]. Získaný preparát byl charakterizován a byla ověřena čistota získaného chlorofylu *a* pomocí následujících metod: UV/VIS spektroskopie, vysikoučinné kapalinové chromatografie (HPLC), hmotnostní spektroskopie (MS) a za použití metod cirkulárního dichroismu.

3.2 UV/VIS SPEKTROSKOPIE

UV/VIS spektroskopie byla použita pro charakterizaci chlorofylu porovnáním spekter komerčního a vyzolovaného chlorofylu *a* a také pro ověření správné koncentrace obtížně rozpustných látek. UV/VIS Spectrophotometer Lambda 20, Perkin-Elmer, USA

3.3 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE (HPLC)

Zavedli jsme HPLC metodu pro stanovení chlorofylu *a* a *b*. Byla zoptimalizována metoda [73], kdy jsme jako stacionární fázi použili kolonu Nucleosil C18 (125 x 4 mm, 5 um, Macherey Nagel, Německo). Analýzy byly prováděny na přístroji Agilent 1200 HPLC s detektorem diodového pole (Agilent, Santa Clara, CA, USA) při vlnové délce 650 nm. Pro zavedení metody byly použity komerční chlorofyly – *a* a *b* ve směsi (Sigma-Aldrich). Retenční časy získané z těchto analýz byly potom dále použity k charakterizaci izolovaných chlorofylů.

3.4 HMOTNOSTNÍ SPEKTROSKOPIE

Hmotnostní spektrometrie ve spojení s HPLC (sestava Agilent 1100, CA, USA). K identifikaci látek byl použit hmotnostní spektrometr TSQ 7000 s trojitým kvadrupólem (Thermo Scientific, Německo) a elektrosprejovou ionizací. Hmotnostní spektra (MS) izolovaných chlorofylů byla měřena v metanolovém rozpouštědle a porovnána s literaturou [74].

3.5 SPEKTROSKOPIE VIBRAČNÍHO CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU (VCD), ELEKTRONOVÉHO CIRKULÁRNÍHO DICHROISMU (ECD), A INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE (IČ)

Pro další charakterizaci izolátu chlorofylu *a* byly použity metody cirkulárního dichroismu (CD), konkrétně vibračního CD (VCD) a elektronového CD (ECD), a také metoda infračervené spektroskopie (IČ). VCD a IČ absorpční spektra byla měřena a za použití spektrometru ISF66 / S FTIR ve spojení s modulem PMA 37 VCD (Bruker, Ettlingen, Německo) ve spektrální oblasti od 1800 do 1300 cm^{-1} , signál byl sbírán po dobu 20 minut. ECD spektra byla měřena pomocí ECD spektrometru J-810 (Jasco, Tokio, Japonsko) ve spektrální oblasti 300-750 nm. V UV oblasti byly použity křemenné kyvety (Starna, Pfungstadt, Německo) a ve VIS oblasti byly použity 1 cm kyvety (Hellma, Müllheim, Německo). VCD a ECD spektra vyizolovaného chlorofylu *a* byla měřena v benzenu, pro IČ spektra byl použit deuterovaný benzen- d_6 .

3.6 BUNĚČNÉ LINIE

Pro *in vitro* studie byly použity následující buněčné linie: buňky lidského adenokarcinomu pankreatu: PaTu-8902 (DSMZ, Braunschweig, Německo), MiaPaCa-2 a BxPC-3 (ATCC, Manassas, VA, USA), buňky lidského hepatoblastomu HepG2 (ATCC, Manassas, VA, USA), karcinomu prostaty PC3 (DSMZ, Braunschweig, Německo) a imortalizované endoteliální buňky EA.hy926 poskytnuté Dr. Jiřím Neužillem z Griffith University v Austrálii (získané fúzí lidských primárních buněk z umbilikální žíly s thioguanin rezistentním klonem A549 a následnou selekcí v HAT médiu).

Všechny buněčné linie byly udržovány ve zvlhčené atmosféře (obsahující 5% CO_2 při 37°C) v médiu obsahujícím 10% fetálního bovinního séra: PaTu-8902, MiaPaCa-2 a EA.hy926 v DMEM, HepG2 v MEM a BxPC-3 v RPMI ve směsi médií EMEM/F12 (1:1).

3.7 TESTY VIABILITY

a) MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromid) test

Buňky byly kultivovány v 96-jamkové destičce s testovanými látkami po dobu 24 hodin. Poté byly inkubovány po dobu 2 hodin s novým médiem obsahujícím MTT (v koncentraci 1 mg/ml) a obarvené buňky byly rozpuštěny v dimetylsulfoxidu (DMSO). Tímto testem je měřena změna fluorescence, která odpovídá aktivitě mitochondriálních oxidoreduktáz a tedy i buněčné viabilitě. Absorbance byla měřena při vlnové délce 540 nm ELISA readerem Sunrise (Tecan, Rakousko), vyhodnocená data byla sbírána programem Magelan-6 (Tecan, Rakousko).

b) Luminiscenční test viability

Bylo použito vysoce citlivé luminiscenční stanovení (CellTiter Glo, Promega) na přístroji Synergy^{TM2} (2010, BioTek Instrument Inc.; Winooski, Vermont, USA; software Gen5TM). Je založeno na stanovení počtu živých buněk na základě jimi uvolněného ATP. Buňky byly pipetovány v malém množství, aby v době experimentu měly konfluenci cca 30 % a lyzovány. Ovlivnění působky probíhalo po dobu 24 hodin. ATP z nich uvolněné přeměnilo luciferin, který byl součástí reakční směsi, na oxyluciferin, jehož luminiscence byla měřena.

3.8 STANOVENÍ POČTU BUNĚK

Krystalovou violetí (CV)

Touto metodou je možné stanovit počet živých buněk zafixovaných na dně jamek, přesněji tedy poměr množství buněk ovlivněných působky oproti množství kontrolních buněk. Příprava buněk probíhala obdobně jako u MTT testu; buňky byly vysety na 96-jamkovou destičku, po přisednutí bylo přidáno médium obsahující testované látky, s kterými byly inkubovány 24 hodin. Poté byl buňkám do média přidán glutaraldehyd k jejich zafixování na dno jamek. Buněčná jádra byla obarvena CV a buňky byly rozpuštěny v 10 % kyselině octové. Intenzita absorbance měřená při vlnové délce 590 nm (ELISA reader Sunrise s vyhodnocovacím programem Magelan-6, Tecan, Rakousko) odpovídala počtu všech živých buněk v jamce [75, 76].

Automatickým počítacem buněk

Buňky byly počítány na automatickém počítací buněk CountessTM Cell Counter (Thermo Fisher Scientific Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA). Buněčná suspenze byla vždy zředěna 1:1 s trypanovou modří,

díky které bylo možné odlišit živé buňky. Dále bylo používáno počítadlo Cellometer Auto T4 Cell Viability Counter (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA, USA), kde nebylo třeba používat barvivo pro odlišení živých a mrtvých buněk.

Bürkerovou počítací komůrkou

Poslední metodou počítání buněk bylo ruční počítání pomocí Bürkerovy počítací komůrky. Na důležitá měření byly využívány všechny tři metody a výsledky z nich byly porovnávány.

3.9 KLONOGENNÍ ANALÝZA

Klonogenní analýza je biologická metoda pro studium účinnosti specifického činidla na schopnost přežití a proliferaci buněk. Buňky byly na kultivační misky vysety ve velice řídké koncentraci a na konci experimentu bylo sledováno procento buněk, které přežily. V našich experimentech byly buňky vysety v počtu 6000 buněk/10 cm² kultivační misku. Po přisednutí buněk k povrchu (cca po 2 hodinách) byla miska ovlivněna chlorofylem *a* v koncentraci 125 μmol/L. Buňky byly ponechány 7 dní v inkubátoru (36°C, 5% CO₂).

Na konci experimentu bylo odstraněno médium, buňky 2x promyty PBS pufrům a 30 minut barveny roztokem 0,5% krystalové violeti s 6% glutaraldehydem [77]. Obarvené buňky byly promyty vodou a jednotlivé kolonie spočítány a vyfotografovány.

3.10 STANOVENÍ AKTIVITY HMOX

Buňky lidského adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902, MiaPaCa-2 a prostaty PC3 byly inkubovány po dobu 24 hodin s testovanými terapeutiky. Po inkubaci byly buňky 3x promyty roztokem PBS (fosfátový pufr 0,1 M, pH 7,4), sklizeny (seškrábány z povrchu misek), odstředěny (1800 RPM, 10 min, 4°C) a každá peleta byla resuspendována v 200 μL PBS. Takto připravené buněčné suspenze uchovávané na ledu byly homogenizovány pomocí sonikátoru s ultrazvukovou jehlou. Ve vzorku byla měřena koncentrace bílkovin. Aktivita HMOX byla stanovena měřením produkce oxidu uhelnatého (CO), vznikajícího v reakci katalyzované HMOX1 při rozkladu hemu, pomocí modifikované metody plynové chromatografie [78]. Přístrojem pro měření byl plynový chromatograf s detektorem redukčního plynu = GC-RGD (Trace Analytical, CA, USA). Vialky byly po uzavření silikonovými septy pročištěny vzduchem bez CO a ve vialce se při průběhu reakce hromadil pouze CO z hemoxygenázové reakce. CO, nasátý z vialky, přecházel do vyhřátého prostoru s oxidem rtuťnatým a rtuťnaté páry byly detekovány pomocí UV spektrofotometru umístěnému za reakčním prostorem. Množství rtuťnatých par produkované v této reakci bylo přímo úměrné vstupující koncentraci CO. Aktivita byla vyjádřena v pmol CO/h/mg proteinu.

3.11 IZOLACE RNA A REAL-TIME PCR

Buňky PaTu-8902 byly nejdříve inkubovány 24 hodin a pak ovlivněny různými působky po dobu 4 hodin. RNA byla z buněk izolována pomocí PerfectPure RNA Cultured Cell Kit (5Prime, Hamburg, Germany). Kvalita a koncentrace RNA byla měřena na spektrofotometru Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Franklin, MA, USA).

Pomocí soupravy High Capacity cDNA (5Prime, Hamburg, Německo) byla provedena reverzní transkripce, kterou byla RNA přepsána na cDNA. Primery pro stanovení exprese genu pro *HMOX1* a *BLVRA* pomocí metody Real time-PCR (RT-PCR) byly navrženy za použití softwaru Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) a syntetizovány společností Generi Biotech (Hradec Králové, ČR). RT-PCR byla provedena ve směsi obsahující SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), specifické primery a cDNA. Všechny RT-PCR byly prováděny v tetrapletech na zařízení ViiATM7 (Applied Biosystems).

3.12 STANOVENÍ MMP

K měření byla použita fluorescenční lipofilní kladně nabitá barvička JC-1 (Invitrogen, CA, USA), která může vstoupit do mitochondrií živých buněk, kde dojde k reversibilní změně její barvy ze zelené na červenou, přičemž intenzita červeného zbarvení je přímo úměrná nárůstu MMP. Ovlivněné buňky byly inkubovány s barvičkou JC-1 po dobu 30 minut. MMP byl poté stanoven za použití metody průtokové cytometrie (BD LSRII, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) a vypočten jako pokles intenzity hodnoty podílu fluorescence

červené barvy (při emisní vlnové délce 590 nm) ku zelené (emisní vlnová délka 525 nm). Pro tento experiment byly zvoleny buňky lidského hepatoblastomu HepG2 jako vhodný buněčný model pro tento typ analýz. [79, 80] Použitými působky byl chlorofylin a extrakt ze sinice *S. platensis*, ze které jsme izolovali chlorofyl *a*.

3.13 STANOVENÍ MITOCHONDRIÁLNÍ PRODUKCE SUPEROXIDU

Produkce superoxidového aniontu v mitochondriální matrix byla stanovována jako časově závislé zvýšení intenzity fluorescence selektivního barviva MitoSOX (Life Technologies, Pleasanton, CA, USA) v buňkách inkubovaných s potenciálními terapeutiky. Stanovení probíhalo pomocí průtokové cytometrie (průtokový cytometr BD LSRII, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Po 24 hodinové inkubaci s terapeutiky bylo odebráno médium, buňky byly promyty PBS, trypsinizovány a opětovně resuspendovány v malém množství (200 μ L) původně odebraného média, abychom minimalizovali buněčný stres, a následně bylo k buňkám přidáno na 15 minut barvivo MitoSOX. Každý vzorek byl měřen bez i s přidavkem rotenonu, který se k buňkám přidává bezprostředně před každým měřením v koncentraci 10 μ mol/L pro zvýšení produkce mitochondriálního superoxidu [81].

Změna fluorescence byla měřena v minutových intervalech po dobu 16 min a byla odrazem produkce superoxidu. Z nárůstu přímek byly spočítány jejich směrnice a při závěrečném vyhodnocení byly vyneseny do poměru směrnice přímký s rotenonem ku směrnici bez rotenonu.

3.14 STANOVENÍ REDOXNÍHO STAVU GLUTATHIONU (GSH/GSSG)

Testovanými terapeutiky byl chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a feofytin *a* v koncentracích 10 μ mol/L a chlorofylin v koncentraci 30 μ mol/L. Buňky byly pěstovány na 10 cm^2 miskách tak, aby výsledná konfluencia nepřesáhla 60 %. Po 24 hodinové inkubaci s terapeutiky byly buňky seškrábány, 3x promyty PBS, centrifugovány (5000 g, 10 min, 4 °C) a buněčná peleta byla až do doby analýzy skladována v tekutém dusíku pro minimalizaci oxidace GSH. Maximální doba skladování vzorků nepřesáhla 4 týdny. V den měření byly pelety resuspendovány ve směsi aceton:voda (70:30), homogenizovány ultrazvukem, stočeny (15000 g, 20 min, 4 °C) a supernatanty byly analyzovány kapilární zónovou elektroforézou (napětí = 30 kV, detekce 195 nm, Agilent 7100). Jako separační pufr byl použit fosforečnanový pufr o pH 7 a koncentraci 40 mM.

3.15 STANOVENÍ PRODUKCE H₂O₂

Produkce peroxidu vodíku PaTu-8902 buněk byla měřena jako rychlost oxidace fluorogenního indikátoru Amplex Red (Life Technologies) v přítomnosti křenové peroxidázy (HRP, type VI-A, Sigma) [82]. Peroxidáza po dodání zdroje peroxidu a vhodného substrátu, který oxiduje a mění jeho barvu, vizualizuje reakci.

Buňky byly předem inkubovány po dobu 24 hodin s pigmenty, byly promyty PBS a resuspendovány v křemenných kyvetách. Následně byl přidán Amplex Red (5 μ mol/L) a křenová peroxidáza (10 U/ml). Nárůst fluorescence 565/585 byl měřen po dobu 10 minut spektrofotometricky (spektrofotometr RF-5301-PC, Shimadzu). Působky byly chlorofyly (chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, feofytin *a* a chlorofylin) v koncentracích 10 a 50 μ mol/L.

3.16 STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ KAPACITY CHLOROFYLŮ

Byla měřena antioxidační kapacita různých koncentrací chlorofylů v závislosti na spotřebě antioxidantu Trolox [83]. Trolox je ve vodě rozpustný analog vitamínu E. Radikály byly v reakci generovány peroxidázou a byly detekovány fluorometricky (spektrofotometr Lambda 20, Perkin Elmer Instruments). Výsledky jsou vyjádřeny jako index antioxidační kapacity, který je počítán jako poměr času potřebného k vychytání volných radikálů tetrapyrolu ku času Troloxu, potřebného na totéž. Čím větší index je, tím lepším antioxidantem daná látka je. Testovanými roztoky byl chlorofyl *a*, chlorofyl *b* a chlorofylin v koncentračním rozmezí 10 až 300 μ mol/L.

Stejnou metodou byla měřena také antioxidační schopnost krevního séra athymických nu/nu myší xenotransplantovaných buňkami lidského adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902 (viz dále). Myši byly krmeny chlorofylem *a* po dobu 21 dní. Na konci experimentu byly myši usmrceny a byla stanovena

antioxidační kapacita odebraného séra. Výsledné hodnoty byly porovnány s kontrolní skupinou krmenou placebem.

3.17 STANOVENÍ REDUKTIVNÍ KARBOXYLACE

Stupeň reduktivní karboxylace a glutaminolýzy byl vyhodnocen dle popsané metodiky [84]. Buňky byly inkubovány až do dosažení 80% konfluency, poté bylo médium nahrazeno čerstvým médiem obsahujícím ^{13}C -L-glutamin (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Cambridge, MA, USA) a inkubováno při 37°C po dobu dalších šesti hodin. Nakonec byly buňky sklizeny, pelety byly extrahovány vodou/metanolem/chloroformem (v poměru 1:1:2, Penta, Česká republika) a centrifugovány při 1000 x g po dobu 10 minut. Horní polární fáze byla lyofilizována přes noc. Analyty byly derivatizovány pyridinem/N-(trimetylsilyl)acetamid/chlorotrimetylsilanem (v poměru 9:3:1, Sigma-Aldrich) při 65°C po dobu jedné hodiny. Derivatizované vzorky se vstříkovaly přímo do přístroje pro plynovou chromatografii/hmotnostní spektrometrii (GC-MS, GC 6890N, MD 5973, Agilent) vybaveného difenyl-dimethylpolysiloxanovou kolonou (RESTEK). Při GC analýze byl použit teplotní gradient (10°C za minutu) a vybrané ionty byly monitorovány na hmotnostním detektoru. Aktivita reduktivní karboxylace byla stanovena mírou inkorporace ^{13}C z glutaminu do citrátu (m/z 273 a 274) a malátu (m/z 335 a 336). Kromě toho byla také pozorována syntéza 2-hydroxyglutarátu (m/z 349 a 350). Míra reduktivní karboxylace byla vypočítána jako procentuální podíl ^{13}C -metabolitu (citrát, malát) spolu s mírou syntézy 2-hydroxyglutarátu. Koncentrace laktátu (pmol laktátu na milion buněk) byla měřena podle podobného protokolu se dvěma výjimkami: (1) buňky byly ovlivněny po dobu 12 hodin před sklizní a kultura byla doplněna čerstvým neznačeným médiem (bez ^{13}C -značeného glutaminu), (2) před analytickou přípravou pelet byl přidán vnitřní standard (oxalát, m/z 190, Sigma Aldrich).

3.18 STANOVENÍ AKTIVACE ERK A AKT

Buňky adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902 byly pěstovány v duplikátech v nepřítomnosti (kontrola) nebo v přítomnosti působku (chlorofylu *a* nebo chlorofylinu) po dobu 1 hodiny. Buňky narostlé do 50% konfluency byly lyzovány RIPA pufrem, který byl doplněn inhibitory fosfatázy a proteázy (Protease-Inhibitor Mix G a Phosphatase-Inhibitor-Mix I, Serva, Heidelberg, Německo). Buněčné lyzáty byly pročištěny centrifugací, odděleny SDS-PAGE, blotovány na 0,45 μm nitrocelulóзовých membránách, blokovány v 5% netučném mléce v PBS a sondovány s primárními protilátkami. Pro vizualizaci pomocí infračerveného zobrazovacího systému Odyssey (LI-COR Biosciences) byly použity fluorescenčně značené anti-rabbit IRDye 700 a anti-mouse IRDye 800 sekundární protilátky (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Rabbit fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2), rabbit fosfo-Akt (Ser473), mouse p44/42 MAPK (Erk1/2) a primární protilátky rabbit AKT byly získány z Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Myší p120RasGAP protilátka byla získána od firmy ECM Biosciences LLC (Versailles, KY, USA). Imunobloting s protilátkami ERK1/2 a p120RasGAP byl použit k potvrzení loadingu stejného množství proteinů.

3.19 *IN VIVO* EXPERIMENTY

In vivo studie byly provedeny na athymických nu/nu myších (Charles River Wiga, Sulzfeld, Německo) xenotransplantovaných subkutánně buněčnou linií lidského adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902 (10⁷ buněk/myš, kontrolní skupina n = 7, léčená skupina n = 6). Po dosažení bazální velikosti nádoru (0,15-0,2 cm³, 7 dní po xenotransplantaci) byla zahájena léčba chlorofylem *a* (perorální intubací žaludku, dávka 1,5 mg/kg váhy/den) čistým vehikulem a byl pozorován vliv této léčby na růst nádorů.

Skupina 1 byla léčena chlorofylem *a*, který byl rozpuštěný v malém množství čistého ethanolu a naředěn na patřičný objem čistým rostlinným olejem (výsledná koncentrace ethanolu < 1%), kontrolní skupině byl podáván čistý rostlinný olej. Léčba byla podávána prostřednictvím intragastrické sondy každý den (dávkování 1,5 mg/kg váhy). K posouzení velikosti nádoru byly nádory měřeny ve dvou místech s největším průměrem každé tři dny pomocí posuvného měřítka a objem nádorů vypočítán podle tabulek velikostí nádorů [85]. Po 29 dnech byl experiment ukončen a zvířata byla usmrcena. Krev a vzorky nádorových tkání byly odebrány a uchovávány při -80°C.

Všechny aspekty zvířecích studií a všechny protokoly splňovaly kritéria pro péči a experimentální používání laboratorních zvířat a byly schváleny Etickou komisí pro práci se zvířaty 1. LF UK.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V našich iniciálních studiích byly na experimentálním modelu karcinomu pankreatu zkoumány potenciální antioxidační a antiproliferační účinky sinice *S. platensis* a některých tetrapyrrolů v ní obsažených [7] díky podobnosti tetrapyrrolových struktur s podobně působící molekulou bilirubinu [8, 9]. Bylo zjištěno, že tyto látky zasahují do redoxního stavu nádorové buňky, a že mají velký potenciál jako chemoprotektivní látky, nicméně jejich účinek není v literatuře dostatečně popsán a *S. platensis* obsahuje mnoho látek, které mohou být zodpovědné za pozorované efekty. Pro naši další práci jsme zvolili studium chlorofylů, nejhojněji zastoupených pigmentů na Zemi. Chlorofyly jsou součástí potravinového řetězce a představují molekuly se silnými biologickými účinky. Jejich potenciální příznivé účinky na lidské zdraví byly zaznamenány již v první polovině 20. století [86], avšak přesvědčivá experimentální i klinická data o těchto molekulách nacházíme v odborné literatuře jen sporadicky.

Obecně se předpokládá, že chemoprotektivní účinky chlorofylů jsou zprostředkované jejich schopností vychytávat karcinogeny uvnitř střevního lumen, což bylo dokázáno v čínských a nizozemských klinických studiích [6, 21]. Několik experimentálních studií prokázalo antioxidační [3] a protinádorové účinky chlorofylů [4, 5].

Chlorofylů se v rostlinné říši vyskytuje hned několik typů, které se snadno dostávají do lidského potravinového řetězce. V průběhu životního cyklu rostlin se navíc chlorofyly metabolizují a stárnutím listů či jiných zelených částí rostlin se např. chlorofyl *a* přeměňuje na feofytin *a* [87], což je molekula chlorofylu bez centrálního atomu hořčíku. Předpokládá se, že tyto metabolity by také mohly být zodpovědné za pozitivní účinky těchto molekul. Nicméně je třeba zdůraznit, že způsob, jakým jsou chlorofyly v lidském těle metabolizovány a jak tyto metabolity působí, je zatím ne zcela probádán.

Kvůli proveditelnosti experimentů, z finančních důvodů, byla zaváděna metoda izolace chlorofylu *a*, jeho následná charakterizace a zkoumání výsledné čistoty chlorofylu. Podařilo se zavést tři různé metody pro izolaci chlorofylu *a* z řasy *S. platensis* s různým výtěžky.

HPLC-MS analýza potvrdila, že majoritní pík patří chlorofylu *a* a minoritní pík odpovídal feofytinu *a* (chlorofyl *a* bez centrálního atomu hořčíku), přičemž ke ztrátě hořčíku mohlo dojít během ionizace. IČ a VCD spektra potvrdila přítomnost skupin charakteristických pro chlorofyl *a* a z ECD spekter můžeme říci, že jsme vyizolovali buď chlorofyl *a* nebo jeho epimer chlorofyl *a'* vysoké čistoty.

Chlorofyl *a* a další přírodní tetrapyrroly jako chlorofyl *b*, feofytin *a* a chlorofylin byly zkoumány zejména pro jejich potenciální protektivní účiny uplatňující se zejména v kancerogenezi. Díky strukturální podobnosti těchto látek s bilirubinem, který je znám pro své protektivní účinky, jsme se zaměřili zejména na biochemické dráhy jím ovlivňované.

V první fázi experimentů jsme se zaměřili na testy viability, buněčné proliferace a růst nádorových a endoteliálních buněk. V těchto *in vitro* experimentech byl zkoumán účinek tetrapyrrolů na různých buněčných liniích, konkrétně na nádorových liniích lidského adenokarcinomu pankreatu (PaTu-8902, BxPC-3, MiaPaCa-2), karcinomu prostaty (PC3) a na endotelové buněčné linii (EA.hy926). Cílem těchto experimentů bylo posouzení antiproliferačních účinků zkoumaných látek a také výběr nejhodnější buněčné linie pro následující experimenty. Jako působek s největším účinkem na buněčnou viabilitu, při nejnižších koncentracích, se ukázal chlorofyl *a* a to i v případech, kdy ostatní tetrapyrroly neměly na buněčnou viabilitu žádný vliv nebo byl patrný až při vyšších koncentracích. U testované buněčné linie PaTu-8902 byl zaznamenán největší pokles buněčné viability při inkubaci s chlorofylem *a* a to již při nejnižší zkoumané koncentraci 10 $\mu\text{mol/L}$. Významný pokles viability při stejné koncentraci byl pozorován také u působků chlorofylu *b* a feofytinu *a*. Chlorofylin působil signifikantní změny viability až při koncentraci 125 $\mu\text{mol/L}$. Výsledky testu viability na této buněčné linii byly ověřeny vysoce citlivým luminiscenčním stanovením. Vyloučili jsme tedy možnost interference stanovení například barevnými tetrapyrroly v buňkách. Statisticky významný rozdíl ve viabilitě buněk MiaPaCa-2 oproti kontrole jsme pozorovali u expozice chlorofylu *a* při koncentraci od 50 $\mu\text{mol/L}$, u chlorofylu *b* od 125 $\mu\text{mol/L}$ a u chlorofylinu až při koncentraci 500 $\mu\text{mol/L}$. Na chlorofyl *a* a chlorofylin byla stejně citlivá i buněčná linie BxPC3, u které jsme však nepozorovali rozdíly v buněčné viabilitě v případě působku chlorofylu *b*. Buňky lidského karcinomu prostaty PC3 byly velmi

citlivé na chlorofyl *a* již od koncentrace 10 $\mu\text{mol/L}$, u chlorofylinu od 125 $\mu\text{mol/L}$ a efekt chlorofylu *b* nebyl pozorován. Důvod k rozdílné reakci k jednotlivým tetrapyrolům napříč liniemi není zcela jasný. Každá ze zkoumaných nádorových linií má trochu odlišné vlastnosti, které mohou zapříčínovat tyto rozdíly. Je známý fakt, že rychle se dělící endoteliální buňky reagují na cytostatika stejně citlivě, jako buňky nádorové. I u těchto buněk jsme zaznamenali rozdíly viability po inkubaci s terapeutiky. Endoteliální buňky EA.hy926 byly nejcitlivější k chlorofylinu (od 10 $\mu\text{mol/L}$), dále k chlorofylu *a* (od 50 $\mu\text{mol/L}$) a k chlorofylu *b* až při koncentraci 125 $\mu\text{mol/L}$. Buněčná linie PaTu-8902 byla nejcitlivější k tetrapyrolovým působkům a proto byla vybrána pro práci v dalších experimentech.

Můžeme shrnout, že počet buněk (měřený CV testem) byl po inkubaci s experimentálními terapeutiky snižován oproti kontrolní skupině v závislosti na koncentraci působku pouze nevýznamně. Zatím co tedy vliv na počet přeživších buněk po 24 hodinovém kontaktu s terapeutiky nebyl prokázán, byla významně ovlivněna viabilita a životaschopnost těchto buněk. V závislosti na typu buněčné linie zkoumané pigmenty chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, chlorofylin a feofytin *a* významně snižovaly buněčnou viabilitu, po 24 hodinové inkubaci s nimi, v koncentračním rozsahu od 10 do 125 $\mu\text{mol/L}$ ($p < 0,05$).

Další variantou testu proliferace na PaTu-8902 buňkách byl klonogenní test, při němž se posuzoval vliv zkoumané látky na iniciaci nádorů. Pokud jednotlivé buňky přežijí, vyrostou z nich kolonie. Chlorofyl *a* v tomto testu působil na jednotlivě vyseté buňky a po sedmi dnech byl pozorován nárůst kolonií v porovnání s kontrolní skupinou. Byla vypočtena účinnost výsadby tzv. P.E. faktor, který říká, kolik buněk se uchytilo a vyrostly z nich kolonie a S.F. faktor který nám říká, z kolika procent léčené kolonie přežily oproti kontrolní skupině. Na miskách exponovaných chlorofylu *a* se uchytilo o polovinu méně kolonií oproti kontrole a z již uchycených buněk jich přežije méně jak 50%. Těmito testy bylo potvrzeno, že nejenom že chlorofyl *a* ovlivňuje viabilitu buněk (MTT test), ale také omezuje schopnost jednotlivých buněk přežít a o více než 50% snižuje schopnost nádorových buněk proliferovat.

Vedle klonogenního stanovení byl proveden další sedmidenní test, kde byly buňky vysety ve větší koncentraci a byl stanoven jejich počet. Počet buněk se snížil na cca 64 % oproti kontrolním buňkám. Výsledky korelují s klonogenním stanovením, kde byly léčené kolonie redukovány na méně jak polovinu oproti kontrolní skupině. Dle předpokladu, pokud buňka není obklopena ostatními buňkami, je náchylnější na přidané působky a má sníženou šanci přežít. V delším časovém intervalu inkubace PaTu-8902 buněk s chlorofylem *a* tedy dochází i k redukci počtu buněk, které jsme při 24 hodinovém CV testu nepozorovali.

Jak bylo zmíněno výše, kvůli strukturální podobnosti zkoumaných tetrapyrolů a hemu nás zajímalo, zdali tyto látky ovlivní expresi klíčových genů katabolismu hemu. Na nádorové buněčné linii adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902 byl zkoumán vliv chlorofylu *a*, chlorofylu *b* a chlorofylinu na expresi *HMOX* a *BLVRA* mRNA. Již při velmi malé koncentraci zkoumaných tetrapyrolů (10 a 30 $\mu\text{mol/L}$) docházelo k výraznému a signifikantnímu poklesu exprese *HMOX* mRNA, zatímco vliv na expresi *BLVRA* mRNA pozorován nebyl. *BLVRA* je přitom enzymem katabolické dráhy hemu s potenciální proliferativní aktivitou [88]. Až několikanásobně zvýšené exprese *BLVRA* mRNA byly pozorovány u hepatocelulárního karcinomu, zatímco *BLVRA* a *HMOX1* hodnoty zůstaly nezměněné [89]. U všech tří tetrapyrolů jsme dále testovali vliv na *HMOX1* aktivitu u buněk adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902, MiaPaCa-2 a adenokarcinomu prostaty PC3. Ve většině případů, kdy byly buňky ovlivněny studovanými tetrapyroly, docházelo ke snížení aktivity *HMOX1* v nádorových buňkách, přičemž nejcitlivější byla opět linie PaTu-8902, která reagovala výrazným snížením *HMOX1* aktivity po inkubaci s chlorofylem *a*, chlorofylem *b* i chlorofylinem při relativně nízkých koncentracích (10 a 30 $\mu\text{mol/L}$). Zvýšená aktivita *HMOX* je považována za mechanismus obrany organismu před zvýšeným oxidačním stresem. Díky produktům katabolismu hemu tak dochází ke snižování oxidační zátěže buňky. Avšak úloha *HMOX* v procesu kancerogeneze není zcela objasněna a publikovaná data jsou značně kontroverzní [90, 91]. Je například známo, že overexprese *HMOX* podporuje buněčný růst a progresi nádorů. Za určitých podmínek zvýšené hladiny *HMOX* podporují i syntézu vaskulárního endoteliálního růstového faktoru VEGF. Data z našich studií ukazují, že chlorofyly měly významný inhibiční vliv na aktivitu *HMOX1* i expresi *HMOX* mRNA. Snížení aktivity *HMOX1* u nádorových buněk se může spolupodílet na zpomalení buněčného růstu a protinádorovém účinku.

Na buňkách lidského hepatoblastomu HepG2 byl studován vliv chlorofylinu a extraktu ze sinice *S. platensis* na redoxní prostředí buňky měřením MMP. Buněčná linie byla zvolena jako vhodný typ buněk pro tento druh analýzy na základě studované literatury [79, 80]. Mitochondriální membránový potenciál (MMP) slouží jako důležitý indikátor při ověřování správné funkce mitochondrií. Pouze funkční mitochondrie vykazují membránový potenciál, jsou schopny výroby energie ve formě ATP a pouze živé buňky mají funkční mitochondrie. Nádorové buňky využívají ve zvýšené míře k získání energie aerobní glykolýzu (Warburgův efekt) a protonový gradient z aerobní fosforylace na mitochondriální membráně není tak výrazný jako u zdravých buněk. [92] Regulace buněčné apoptózy je nezbytná pro správný vývoj organismu a tkáňovou homeostázu. Její průběh může být určen dvěma signálními drahami a to vnější (receptorovou) dráhou řízenou receptory smrti a vnitřní (mitochondriální) apoptotickou dráhou, kde klíčovou roli plní mitochondrie. Mitochondriální buněčná smrt je charakteristická změnou transmembránového potenciálu a permeabilizací vnější mitochondriální membrány. Depolarizace mitochondriální membrány je důležitá pro uvolnění proapoptotických signálů. Sledování stavu mitochondriálního membránového potenciálu, jakožto apoptického markeru, a určení hladiny reaktivních kyslíkových radikálů poskytuje důležité informace a může mít prediktivní hodnotu pro výstup léčebných protokolů. [70] Pilotní experimenty ukazují, že chlorofylin i extrakt ze sinice *S. platensis* obsahující značné množství chlorofylu *a* i chlorofylinu významně snižují membránový potenciál mitochondrií nádorových buněk a ovlivňují tak funkci mitochondrií. Snížením MMP a depolarizací membrány tak může být nádorová buňka náchylnější k apoptóze. V současné době se na našem pracovišti dále pokračuje na zkoumání vlivu tetrapyrolů na MMP.

Po zjištění, že tetrapyroly ovlivňují MMP jsme zkoumali jejich vliv na redoxní prostředí buňky. ROS jsou důležitými signálními molekulami, jejichž cílem jsou transkripční faktory, které jsou aktivovány oxidačním stresem. Nádorové buňky jsou charakteristické zvýšenou tvorbou ROS, které potřebují zejména pro aktivaci růstových faktorů a udržováním angiogeneze. Výsledkem takové signalizace je stimulace buněčné proliferace, indukce apoptózy, poškození genetické informace a vznik mutací, které mohou vést k dalším nádorovým onemocněním. Prvním z cílů byl mitochondriální superoxid, který aktivuje řadu intracelulárních cílů, které představují významné patogenní faktory v kancerogenezi. U buněk léčených chlorofylem *a*, chlorofylem *b*, chlorofylinem a feofytinem *a* ve velmi malých koncentracích (10 $\mu\text{mol/L}$) docházelo k velice výraznému (na 12 – 23% v porovnání s kontrolní skupinou) a významnému poklesu superoxidu produkovaného mitochondriemi. Všechny studované tetrapyroly výrazně redukovaly oxidační zatížení buňky a takto významná redukce superoxidu může přispívat k protinádorovým účinkům těchto látek. Výsledky jsou v souladu s naměřenými hodnotami MMP, který po inkubaci buněk s tetrapyroly výrazně poklesl; klesl tedy protonový gradient na mitochondriální membráně a z toho lze usuzovat, že docházelo k aerobní fosforylaci ve snížené míře. Zdrojem mitochondriálního superoxidu je právě aerobní fosforylace a při snížené aktivitě tohoto procesu dochází i ke snížené tvorbě superoxidu. Dalším vysvětlením tak výrazné redukce superoxidu může být přímá interakce konjugovaných tetrapyrolů s touto reaktivní molekulou.

Jedním z hlavních mechanismů antioxidační ochrany organismu je redukce ROS glutathionem. Byl sledován poměr redukované a oxidované formy glutathionu u buněk adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902 exponovaných chlorofylu *a*, chlorofylu *b*, chlorofylinu a feofytinu *a* v koncentraci 10 $\mu\text{mol/L}$. U všech studovaných tetrapyrolů jsme naměřili zvýšené množství redukovaného glutathionu. Jedním z vysvětlení zvýšených hodnot redukovaného glutathionu oproti kontrolní skupině může být, že chlorofyly mohou samy přímo zhášet ROS a dochází tak k menší spotřebě redukovaného glutathionu. K menší spotřebě tohoto antioxidantu může docházet také díky prokázané snížené produkci mitochondriálního superoxidu. Dalším možným vysvětlením je, že chlorofyly mohou také samy přispívat k regeneraci oxidovaného glutathionu na jeho redukovanou formu. Ať je mechanismus působení jakýkoliv, z naměřených dat je patrné, že chlorofyly přispívají ke zvyšování nitrobuňčného antioxidačního potenciálu.

U buněk adenokarcinomu pankreatu PaTu-8902 byla také měřena produkce H_2O_2 do vnějšího prostředí buňky, která odpovídá koncentraci uvnitř buňky a ukazuje na míru zatížení buněk ROS. Všechny studované tetrapyroly (chlorofyl *a*, chlorofyl *b*, chlorofylin a feofytin *a*) významně snižovaly produkci peroxidu při koncentraci působků 50 $\mu\text{mol/L}$. U koncentrace působků 10 $\mu\text{mol/L}$ jsme nepozorovali statisticky významné změny v produkci peroxidu buňkami oproti kontrole.

Předchozími experimenty bylo zjištěno, že chlorofyly významně zasahují do redoxního prostředí nádorových buněk. Následně jsme měřili, jak rostlinné tetrapyroly ovlivňují celkovou antioxidační kapacitu roztoků *in vitro*. Nejúčinněji zhasel volné radikály ve vodě rozpustný chlorofylin, následně chlorofyl *a* a nejmenší antioxidační kapacitu měl chlorofyl *b*. Nicméně všechny tři tetrapyroly snižovaly koncentraci produkovaných radikálů. Všechny studované tetrapyroly tedy nejen že přispívaly ke snížení celkové koncentrace volných radikálů, ale také významně potlačovaly zatížení buněk ROS a snižovaly celkové buněčné hladiny peroxidu vodíku u nádorových buněk. Toto bylo podpořeno i výsledky vlivu chlorofylů na stav redukováného glutathionu, a ovlivnění redoxního stavu nádorové buňky chlorofyly by tedy mohlo být jedním z mechanismů jejich protinádorového účinku.

Snižování hladiny ROS v nádorech a podpoření antioxidační schopnosti u nádorových buněk vede ke kontroverzním názorům. Na jedné straně, příliš vysoké až toxické hladiny ROS by mohly vést k poškození mitochondriálních membrán, následně by docházelo k uvolňování cytochromu *c* z mitochondrie a ke spuštění apoptózy nádorových buněk. [55] K tomuto však samovolně v nádorových tkáních nedochází a naopak zvýšená produkce ROS podporuje tumorigenezi oxidačním poškozením DNA a biochemickými a molekulárními změnami, které jsou nezbytné k progresi nádoru [54]. Důležité je, že mitochondriální ROS regulují buněčnou redoxní signalizaci a zvýšení jejich produkce se ukazuje jako rozhodující pro kancerogenezi [93, 94]. Nicméně i nádorové buňky se chrání před zvýšeným oxidačním stresem, a některé studie naznačují, že suplementace antioxidantů, včetně N-acetylcysteinu a tokoferolu, může ve skutečnosti dokonce podporovat progresi nádorů [95, 96]. V našich modelových studiích však chlorofyly skutečně potlačovaly progresi karcinomu pankreatu. Tento účinek byl doprovázen oslabenou expresí a aktivitou HMOX1, což je rozhodující složka vnitřního buněčného antioxidačního systému. Tato zjištění mohou mít skutečně význam pro jejich protinádorové účinky, neboť bylo uvedeno, že zvýšená exprese *HMOX1* brání buňky karcinomu pankreatu před cytostatickým působením protinádorových léků [97]. Je důležité poznamenat, že tento účinek může být nádorově specifický, jelikož byl pozorován opačný trend exprese *HMOX1* u endoteliálních buněk lidské umbilikální žíly léčených chlorofylinem [98].

Prekvapivě jsme nepozorovali žádný účinek chlorofylů na glutaminolýzu nebo na reduktivní karboxylaci. Tato zjištění ukazují, že ani glykolýza, ani mitochondriální respirace nebyly ovlivněny léčbou chlorofyly [84]. Zdá se, že antiproliferační účinky chlorofylů ovlivňují redoxní stav nádorových buněk, stejně tak jako produkci ROS, ale do buněčné bioenergetiky nezasahují.

V předchozích studiích bylo uváděno, že chlorofylin down-reguluje signální dráhu PI3K/Akt [99], a že inhibuje proliferaci buněk karcinomu prsu MCF-7 deaktivací ERK [100]. Nicméně, ani chlorofyl *a* ani chlorofylin neměly v našich studiích pankreatických nádorových buněk žádný inhibiční účinek na fosforylaci AKT nebo ERK.

Pro potvrzení protinádorového účinku chlorofylu *a*, který k nádorové linii adenokarcinomu pankreatu Patu-8902 reagoval nejcitlivěji a z *in vitro* studií byl patrný nejvýraznější pokles buněčné viability a efekt na snížení oxidačního zatížení buněk, byla provedena následná *in vivo* studie na nu/nu myších xenotransplantovaných adenokarcinomem pankreatu PaTu-8902. Při *in vivo* studii vlivu účinků chlorofylu *a* na proliferaci lidského adenokarcinomu pankreatu bylo zjištěno, že myši perorálně léčené chlorofylem *a* měly významně menší nádory v porovnání s kontrolní skupinou, a to již od 8. dne léčby. Po 29 dnech byl experiment ukončen a nádory léčené skupiny byly v porovnání s kontrolní skupinou třikrát menší ($1,04 \pm 0,8$ vs. $3,48 \pm 1,5$ cm³, $p=0,012$). Byl tedy prokázán jednoznačný antiproliferační vliv chlorofylu *a* na růst lidského adenokarcinomu pankreatu.

Měřena byla také antioxidační schopnost krevního séra athymických nu/nu myší léčených chlorofylem *a* po dobu 29 dnů. Rozdíl mezi antioxidační kapacitou kontrolní skupiny a skupiny léčené chlorofylem *a* nebyl statisticky významný (kontrolní skupina: Index = $4,9 \pm 1,2$, $n = 7$, skupina léčená chlorofylem *a*: Index = $3,7 \pm 1,1$, $n = 6$, $p>0,05$). Vysvětlením, proč antioxidační kapacita séra po požití chlorofylu významně nevzrostla je, že chlorofyly mají velice špatnou vstřebatelnost a většina (až 95 %) požitého chlorofylu odchází stolicí. Byla provedena studie, kdy byli pacienti krmeni feofytinem a vařeným špenátem, kdy byla na fytole tetrapyrolů navázána radioaktivní molekula. Analyzované tetrapyroly byly z 90–95% nalezeny v nezměněné formě ve stolicí. [101] Tetrapyroly se tedy nedostávají ve zvýšené míře do krevního řečiště, kde by působily

přímo jako antioxidanty, avšak mají jiný mechanismus účinku, který redukuje nádory a snižuje antioxidační zatížení nádorových buněk.

Jak jsme demonstrovali v *in vitro* studiích, mechanismus působení chlorofylů zřejmě probíhá na více úrovních od působení na buněčnou viabilitu nádorových buněk, přes ovlivnění exprese klíčových genů antioxidační ochrany až po samotné vychtávání volných radikálů. Studované chlorofyly jsou schopny pohlcovat volné radikály díky konjugovanému systému dvojných vazeb a přímo tak v organismu působit jako antioxidanty. I když vstřebatelnost chlorofylů do krevního řečiště je relativně malá (cca 5 – 10%), pozorovali jsme výrazné protinádorové a antioxidační účinky těchto molekul *in vivo*. Chlorofyly velice významně zasahují do redoxního prostředí buněk a pomáhají jim ve snižování negativních dopadů volných radikálů.

5 ZÁVĚR

Závěrem lze konstatovat, že potenciální protinádorové účinky chlorofylů jsou zprostředkovávány několika způsoby přes různé metabolické dráhy a souvisí s antioxidační aktivitou, snížením mitochondriální produkce superoxidu a účinky na expresi specifických genů. Fakt, že perorálně podávaný chlorofyl *a* na zvířecím modelu velice výrazně snižoval progresi karcinomu pankreatu a docházelo k velice výrazné redukci nádorů, potvrzuje antiproliferační působení tohoto tetrapyrolu. Na základě zjištěných dat se chlorofyl *a* a další tetrapyroly (chlorofyl *b*, chlorofylin a feofytin *a*) jeví jako slibné chemopreventivní látky, které by se mohly uplatňovat v chemoadjuvantní léčbě nádorových onemocnění. Navíc zvýšený příjem těchto látek běžnou stravou by mohl pomáhat před zvýšeným oxidačním stresem a působit tak preventivně proti vzniku onemocnění podmíněných tímto mechanismem. K potvrzení těchto slibných předpokladů, vycházejících především z experimentálních dat jsou nezbytné a žádoucí klinicko-epidemiologické humánní studie.

6 LITERATURA

1. Glade, M.J., *Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective*. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. Nutrition, 1999. **15**(6): p. 523-6.
2. Huang, M.-T., T. Ferraro, and C.-T. Ho, *Cancer Chemoprevention by Phytochemicals in Fruits and Vegetables*, in *Food Phytochemicals for Cancer Prevention I*. 1993, Am. Chem. Soc. p. 2-16.
3. Kamat, J.P., K.K. Bloor, and T.P. Devasagayam, *Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage in vitro and ex vivo*. Biochim. Biophys. Acta, 2000. **1487**(2-3): p. 113-27.
4. Chernomorsky, S., A. Segelman, and R.D. Poretz, *Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumor cell growth*. Teratog. Carcinog. Mutagen., 1999. **19**(5): p. 313-22.
5. Castro, D.J., et al., *Identifying efficacious approaches to chemoprevention with chlorophyllin, purified chlorophylls and freeze-dried spinach in a mouse model of transplacental carcinogenesis*. Carcinogenesis, 2009. **30**(2): p. 315-20.
6. Egner, P.A., et al., *Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2001. **98**(25): p. 14601-6.
7. Konickova, R., et al., *Anti-cancer effects of blue-green alga Spirulina platensis, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds*. Ann. Hepatol., 2014. **13**(2): p. 273-83.
8. Wu, T.W., K.P. Fung, and C.C. Yang, *Unconjugated bilirubin inhibits the oxidation of human low density lipoprotein better than Trolox*. Life Sci., 1994. **54**(25): p. P477-81.
9. Vitek, L. and H.A. Schwertner, *The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases*. Adv. Clin. Chem., 2007. **43**: p. 1-57.
10. Baranano, D.E., et al., *Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2002. **99**(25): p. 16093-8.
11. Blank, A., Galili T., and Levanon H., *Triplet porphyrins as donors in intramolecular electron transfer and their intermolecular interaction with free radicals*. J. Porphyrins Phthalocyanines, 2001. **05**(01): p. 58-66.
12. Fujisawa, J.-i., Y. Ohba, and S. Yamauchi, *Electron-Spin Polarizations Generated from Interactions between Excited Triplet Porphyrins and Stable Radicals Studied by Time-Resolved Electron Paramagnetic Resonance*. J. Phys. Chem. A, 1997. **101**(4): p. 434-439.
13. Arimoto-Kobayashi, S., et al., *Iron-chlorophyllin-mediated conversion of 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2(NHOH)) into its nitroso derivative*. Mutat. Res., 1998. **400**(1-2): p. 259-69.
14. Woziwodzka A., G.G., Piosik J., *Heterocyclic Aromatic Amines Heterocomplexation with Biologically Active Aromatic Compounds and Its Possible Role in Chemoprevention*. ISRN Biophysics, 2013. **2013** (Article ID 740821): p. 11 pages.
15. Waters, M.D., et al., *Activity profiles of antimutagens: in vitro and in vivo data*. Mutat. Res., 1996. **350**(1): p. 109-129.
16. Ferruzzi, M.G. and J. Blakeslee, *Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives*. Nutrition Research. **27**(1): p. 1-12.
17. Das, J., et al., *Nano-encapsulated chlorophyllin significantly delays progression of lung cancer both in in vitro and in vivo models through activation of mitochondrial signaling cascades and drug-DNA interaction*. Environ. Toxic. Pharmac., 2016. **46**: p. 147-157.
18. Sofrová, D.a.k., *Biochemie - základní kurz*. 2009: Karolinum.
19. Libor, V., *Bilirubin a interní choroby: Význam pro kliniku a praxi*. 2009.
20. Fernandes, T.M., B.B. Gomes, and U.M. Lanfer-Marquez, *Apparent absorption of chlorophyll from spinach in an assay with dogs*. Innov. Food Sci. Emerg. Technol., 2007. **8**(3): p. 426-432.
21. Balder, H.F., et al., *Heme and Chlorophyll Intake and Risk of Colorectal Cancer in the Netherlands Cohort Study*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 2006. **15**(4): p. 717-725.
22. de Vogel, J., et al., *Green vegetables, red meat and colon cancer: chlorophyll prevents the cytotoxic and hyperproliferative effects of haem in rat colon*. Carcinogenesis, 2005. **26**(2): p. 387-393.
23. Gazzin, S., et al., *A novel perspective on the biology of bilirubin in health and disease*. Trends Mol. Med., 2016. **22**(9): p. 758-68.
24. Vitek, L., *The role of bilirubin in diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases*. Front Pharmacol., 2012. **3**: p. 55.

25. Fang, J., T. Akaike, and H. Maeda, *Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment*. *Apoptosis*, 2004. **9**(1): p. 27-35.
26. Dulak, J., et al., *Heme oxygenase activity modulates vascular endothelial growth factor synthesis in vascular smooth muscle cells*. *Antioxid. Redox Signal.*, 2002. **4**(2): p. 229-40.
27. Ferrando, M., et al., *Heme oxygenase 1 (HO-1) challenges the angiogenic switch in prostate cancer*. *Angiogenesis*, 2011. **14**(4): p. 467-79.
28. Schmidt, K.N., et al., *The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF- κ B*. *Chem. Biol.*, 1995. **2**(1): p. 13-22.
29. Hay, N. and N. Sonenberg, *Upstream and downstream of mTOR*. *Genes Dev.*, 2004. **18**(16): p. 1926-45.
30. West, A.P., G.S. Shadel, and S. Ghosh, *Mitochondria in innate immune responses*. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011. **11**(6): p. 389-402.
31. Mulder, G.J., *Conjugation Reactions In Drug Metabolism*. 2005: Taylor & Francis e-Library.
32. Bylund, J., et al., *Measurement of Respiratory Burst Products, Released or Retained, During Activation of Professional Phagocytes*, in *Neutrophil Methods and Protocols*, M.T. Quinn and F.R. DeLeo, Editors. 2014, Humana Press: Totowa, NJ. p. 321-338.
33. Sazontova, T.G., et al., *[Reactive oxygen species and redox-signaling during adaptation to changes of oxygen level]*. *Fiziol. Zh. (Kiev, Ukraine : 1994)*, 2008. **54**(2): p. 18-32.
34. Jackson, M.J. and A. McArdle, *Age-related changes in skeletal muscle reactive oxygen species generation and adaptive responses to reactive oxygen species*. *J. Physiol.*, 2011. **589**(Pt 9): p. 2139-45.
35. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. *Biochem. J.*, 2009. **417**(1): p. 1-13.
36. Dröse, S., U. Brandt, and I. Wittig, *Mitochondrial respiratory chain complexes as sources and targets of thiol-based redox-regulation*. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2014. **1844**(8): p. 1344-1354.
37. Mohanty, J.G., E. Nagababu, and J.M. Rifkind, *Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging*. *Front. Physiol.*, 2014. **5**: p. 84.
38. Amanso, A., A.N. Lyle, and K.K. Griendling, *NADPH Oxidases and Measurement of Reactive Oxygen Species*, in *Hypertension: Methods and Protocols*, R.M. Touyz and E.L. Schiffrin, Editors. 2017, Springer New York: New York, NY. p. 219-232.
39. Pisoschi, A.M. and A. Pop, *The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review*. *Eur. J. Med. Chem.*, 2015. **97**: p. 55-74.
40. Matsumoto, H., et al., *Carbon monoxide and bilirubin from heme oxygenase-1 suppresses reactive oxygen species generation and plasminogen activator inhibitor-1 induction*. *Mol. Cell Biochem.*, 2006. **291**(1-2): p. 21-8.
41. H A Lardy, a. and S.M. Ferguson, *Oxidative Phosphorylation in Mitochondria*. *Annu. Rev. Biochem.*, 1969. **38**(1): p. 991-1034.
42. Sazanov, L.A., *A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2015. **16**(6): p. 375-88.
43. Hatefi, Y., *The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorylation System*. *Annu. Rev. Biochem.*, 1985. **54**(1): p. 1015-1069.
44. Schultz, B.E. and S.I. Chan, *Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes*. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2001. **30**: p. 23-65.
45. Dimroth, P., G. Kaim, and U. Matthey, *Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F(1)F(o) ATP synthases*. *J. Exp. Biol.*, 2000. **203**(Pt 1): p. 51-9.
46. Chen, L.B., *Mitochondrial Membrane Potential in Living Cells*. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1988. **4**(1): p. 155-181.
47. Heinz, S., et al., *Mechanistic Investigations of the Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone in the Context of Pharmacological and Safety Evaluation*. *Scientific Reports*, 2017. **7**: p. 45465.
48. Devenish, R.J., et al., *The Oligomycin Axis of Mitochondrial ATP Synthase: OSCP and the Proton Channel*. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2000. **32**(5): p. 507-515.
49. Hanstein, W.G., *Uncoupling of oxidative phosphorylation*. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics*, 1976. **456**(2): p. 129-148.
50. Diebold, L. and N.S. Chandel, *Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells*. *Free Radic. Biol. Med.*, 2016. **100**: p. 86-93.
51. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-674.

52. Szatrowski, T.P. and C.F. Nathan, *Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells*. *Cancer Res.*, 1991. **51**(3): p. 794-8.
53. Pelicano, H., D. Carney, and P. Huang, *ROS stress in cancer cells and therapeutic implications*. *Drug Resist. Updat.*, 2004. **7**(2): p. 97-110.
54. Ames, B.N., M.K. Shigenaga, and T.M. Hagen, *Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A*, 1993. **90**(17): p. 7915-7922.
55. Galadari, S., et al., *Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress?* *Free Radic. Biol. Med.*, 2017. **104**: p. 144-164.
56. Glasauer, A. and N.S. Chandel, *Targeting antioxidants for cancer therapy*. *Biochem. Pharmacol.*, 2014. **92**(1): p. 90-101.
57. Fuchs-Tarlovsky, V., *Role of antioxidants in cancer therapy*. *Nutrition*, 2013. **29**(1): p. 15-21.
58. Huang, P., et al., *Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells*. *Nature*, 2000. **407**(6802): p. 390-395.
59. Srinivasan, S., et al., *Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2017.
60. Guerra, F., A.A. Arbini, and L. Moro, *Mitochondria and cancer chemoresistance*. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Bioenergetics*.
61. Elstrom, R.L., et al., *Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells*. *Cancer Res.*, 2004. **64**(11): p. 3892-9.
62. Liberti, M.V. and J.W. Locasale, *The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?* *Trends Biochem. Sci.*, 2016. **41**(3): p. 211-8.
63. Baffy, G., *Mitochondrial uncoupling in cancer cells: Liabilities and opportunities*. *Biochim. Biophys. Acta*, 2017.
64. Gatenby, R.A. and R.J. Gillies, *Why do cancers have high aerobic glycolysis?* *Nat. Rev. Cancer*, 2004. **4**(11): p. 891-899.
65. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation*. *Science (New York, N.Y.)*, 2009. **324**(5930): p. 1029-1033.
66. Pelicano, H., et al., *Mitochondrial respiration defects in cancer cells cause activation of Akt survival pathway through a redox-mediated mechanism*. *J. Cell Biol.*, 2006. **175**(6): p. 913-923.
67. Gogvadze, V., S. Orrenius, and B. Zhivotovsky, *Mitochondria in cancer cells: what is so special about them?* *Trends Cell Biol.*, 2008. **18**(4): p. 165-173.
68. Horvitz, H.R., *Genetic Control of Programmed Cell Death in the Nematode *Caenorhabditis elegans**. *Cancer Res.*, 1999. **59**(7 Supplement): p. 1701s-1706s.
69. Vaux, D.L. and S.J. Korsmeyer, *Cell Death in Development*. *Cell*, 1999. **96**(2): p. 245-254.
70. Pekarčíková, L., et al., *[The use of flow cytometry for analysis of the mitochondrial cell death]*. *Klin. onkol.: casopis Ceske a Slovenske onkologicke spolcnosti*, 2014. **27 Suppl 1**: p. S15-21.
71. Crompton, M., *The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death*. *Biochem. J.*, 1999. **341**(2): p. 233-249.
72. Iriyama, K., N. Ogura, and A. Takamiya, *A simple method for extraction and partial purification of chlorophyll from plant material, using dioxane*. *J. Biochem.*, 1974. **76**(4): p. 901-4.
73. Wong, C.K. and C.K. Wong, *HPLC pigment analysis of marine phytoplankton during a red tide occurrence in Tolo Harbour, Hong Kong*. *Chemosphere*, 2003. **52**(9): p. 1633-40.
74. Suzuki, T., H. Midonoya, and Y. Shioi, *Analysis of chlorophylls and their derivatives by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry*. *Anal. Biochem.*, 2009. **390**(1): p. 57-62.
75. Kueng, W., E. Silber, and U. Eppenberger, *Quantification of cells cultured on 96-well plates*. *Anal. Biochem.*, 1989. **182**(1): p. 16-9.
76. Gillies, R.J., N. Didier, and M. Denton, *Determination of Cell Number in Monolayer-Cultures*. *Anal. Biochem.*, 1986. **159**(1): p. 109-113.
77. Franken, N.A., et al., *Clonogenic assay of cells in vitro*. *Nat. Protoc.*, 2006. **1**(5): p. 2315-9.
78. Vreman, H.J. and D.K. Stevenson, *Heme oxygenase activity as measured by carbon monoxide production*. *Anal. Biochem.*, 1988. **168**(1): p. 31-8.
79. Bova, M.P., et al., *Troglitazone induces a rapid drop of mitochondrial membrane potential in liver HepG2 cells*. *Toxicol. Lett.*, 2005. **155**(1): p. 41-50.

80. Wang, M., et al., *Curcumin induced HepG2 cell apoptosis-associated mitochondrial membrane potential and intracellular free Ca²⁺ concentration*. Eur. J. Biochem., 2011. **650**(1): p. 41-47.
81. Drose, S. and U. Brandt, *The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc₁ complex*. J. Biol. Chem., 2008. **283**(31): p. 21649-54.
82. Votyakova, T.V. and I.J. Reynolds, *DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria*. J. Neurochem., 2001. **79**(2): p. 266-77.
83. Iuliano, L., et al., *Fluorescence quenching of dipyradamole associated to peroxy radical scavenging: a versatile probe to measure the chain breaking antioxidant activity of biomolecules*. Biochim. Biophys. Acta, 2000. **1474**(2): p. 177-82.
84. Smolkova, K., et al., *Reductive carboxylation and 2-hydroxyglutarate formation by wild-type IDH2 in breast carcinoma cells*. Int. J. Biochem. Cell Biol., 2015. **65**: p. 125-33.
85. Tomayko, M.M. and C.P. Reynolds, *Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice*. Cancer Chemother. Pharmacol., 1989. **24**(3): p. 148-54.
86. Carpenter, E.B., *Clinical experiences with chlorophyll preparations with particular reference to chronic osteomyelitis and chronic ulcers*. Am. J. Surg., 1949. **77**(2): p. 167-71.
87. Helfrich, M., et al., *Chlorophyll synthetase cannot synthesize chlorophyll a'*. Eur. J. Biochem., 1994. **219**(1-2): p. 267-75.
88. Gibbs, P.E., T. Miralem, and M.D. Maines, *Biliverdin reductase: a target for cancer therapy?* Front Pharmacol., 2015. **6**: p. 119.
89. Kubickova, K.N., et al., *Predictive role BLVRA mRNA expression in hepatocellular cancer*. Ann. Hepatol., 2016. **15**(6): p. 881-887.
90. Was, H., J. Dulak, and A. Jozkowicz, *Heme oxygenase-1 in tumor biology and therapy*. Curr. Drug Targets, 2010. **11**(12): p. 1551-70.
91. Dulak, J., et al., *Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in Vascular Pathobiology: Focus on Angiogenesis*. Circulation, 2008. **117**(2): p. 231-241.
92. Johnson, L.V., et al., *Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy*. J. Cell Biol., 1981. **88**(3): p. 526-535.
93. Sabharwal, S.S. and P.T. Schumacker, *Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel?* Nat. Rev. Cancer, 2014. **14**(11): p. 709-21.
94. Weinberg, F., et al., *Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 2010. **107**(19): p. 8788-93.
95. Sayin, V.I., et al., *Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice*. Sci. Transl. Med., 2014. **6**(221): p. 221ra15.
96. Piskounova, E., et al., *Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells*. Nature, 2015. **527**(7577): p. 186-91.
97. Berberat, P.O., et al., *Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of pancreatic cancer cells to anticancer treatment*. Clin. Cancer Res., 2005. **11**(10): p. 3790-8.
98. Zhang, Y., et al., *Protection of chlorophyllin against oxidative damage by inducing HO-1 and NQO1 expression mediated by PI3K/Akt and Nrf2*. Free Radic. Res., 2008. **42**(4): p. 362-71.
99. Nagini, S., et al., *Chlorophyllin abrogates canonical Wnt/beta-catenin signaling and angiogenesis to inhibit the development of DMBA-induced hamster cheek pouch carcinomas*. Cell Oncol. (Dordr), 2012. **35**(5): p. 385-95.
100. Chiu, L.C., C.K. Kong, and V.E. Ooi, *The chlorophyllin-induced cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells is associated with ERK deactivation and Cyclin D1 depletion*. Int. J. Mol. Med., 2005. **16**(4): p. 735-40.
101. Baxter, J.H., *Absorption of chlorophyll phytol in normal man and in patients with Refsum's disease*. J. Lipid Res., 1968. **9**(5): p. 636-41.

SEZNAM PUBLIKACÍ:

Podklad disertace

1. Koničková R, **Vaňková K**, Vaníková J, Váňová K, Muchová L, Subhanová I, Zadinová M, Zelenka J, Dvořák A, Kolář M, Strnad H, Rimpelová S, Ruml T, J Wong R, Vitek L: *Anti-cancer effects of blue-green alga Spirulina platensis, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds*. Ann Hepatol. 2014 Mar-Apr;13(2):273-83. IF 2,3
2. **Vaňková K**, Marková I., Jašprová J, Dvořák A, Subhanová I, Zelenka J, Novosádová I., Rasl J, Vomastek T, Sobotka R, Muchová L, Vitek L: *Chlorophyll-mediated changes in the redox status of pancreatic cancer cells are associated with its anti-cancer effects*. Oxid Med Cell Longev. Accepted 19 April 2018. IF 4.593

Rozpracovaná publikace:

Marková I, Koničková R, **Vaňková K**, Leníček M, Kolář M, Strnad H, Hroudová M, Rasl J, Vomastek T, Nachtigal P, Němečková I, Vitek L: *Antiangiogenic effects of blue-green alga Arthrospira pl. on pancreatic cancer*.

ÚČASTI NA KONFERENCÍCH:

1. Zing-Cancer Conference, Mexiko
Vaňková K, Koničková R, Vaníková J, Subhanová I, Muchová L a Vitek L: *Can inhibition of heme oxygenase activity account for antiproliferative effects of chlorophyll?* 2011
2. Zing-Cancer Conference, Mexiko
Koničková R, **Vaňková K**, Vaníková J, Lešetický L, Vitek L: *Can phycoerythrin account for antiproliferative effects of blue-green alga Spirulina platensis*. 2011
3. XXXIX. Májové hepatologické dny, Karlovy Vary
Koničková R, **Vaňková K**, Zadinová M, Vitek L: *Antiproliferační vliv fykocyjanobilinu na karcinom pankreatu*. 2011
4. Trieste Yellow Retreat, Terst, Itálie
Koničková R, **Vaňková K**, Vaníková J, Zadinová M, Lešetický L, Vitek L: *Antiproliferative effect of phycoerythrin*. 2011
5. 7th International Congress on Heme Oxygenases and Related Enzymes, Edinburgh, UK
Koničková R, **Vaňková K**, Vaníková J, Zelenka J, Dvořák A, Subhanová I, Muchová L, Zadinová M, Vitek L: *Effects of plant tetrapyrrolic compounds on pancreatic cancer and heme oxygenase activity*. 2012
6. Trieste Yellow Retreat, Terst, Itálie
Spoluautorství: *Molecular basis of anticancer effects of spirulina platensis and algal tetrapyrroles*. 2013
7. Studentská vědecká konference, 1.LF UK, Praha
Vítězná práce, 1. místo 15. SVK 1.Lékařské fakulty
Vaňková K: *Studium antiproliferativních účinků chlorofylu*. 2014
8. XLII. Májové hepatologické dny, Karlovy Vary
Vaňková K, Koničková R, Vaníková J, Váňová K, Dvořák A, Zelenka J, Muchová L and Vitek L: *Vliv antiproliferačních účinků chlorofylu na růst lidského adenokarcinomu pankreatu*. 2014